云 南 植 物 研 究 2010, 32 (4): 323～327
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724/SP.J.1143.2010.09131

莴苣胚囊细胞分离*

陈 琳[1], 张亚楠[1], 邱义兰[2], 田惠桥[1]**
(1 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

摘要: 用酶解和解剖方法分离了莴苣的卵细胞, 助细胞, 中央细胞和合子。莴苣子房先在酶液中酶解 40～50 min, 然后在不含酶的分离液中用解剖针解剖子房。在解剖出的胚囊中, 可看到卵细胞, 两个助细胞和中央细胞的轮廓。将胚囊的合点端切破, 轻轻挤压胚囊的珠孔端, 四个细胞即可逸出。在最佳条件下, 90 min 可从 40 个子房中分离出 29 个胚囊, 进一步从中分离出 11 个卵细胞。分离出的胚囊细胞用显微操作仪收集备用。莴苣卵细胞的成功分离为进行离体受精探索创造了条件。

关键词: 莴苣; 卵细胞; 助细胞; 中央细胞; 分离
中图分类号: Q 944 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2010)04-323-05

Isolation of Embryo Sac Cells of Lettuce (*Lactuca sativa*)

CHEN Lin[1], ZHANG Ya-Nan[1], QIU Yi-Lan[2] TIAN Hui-Qiao[1]**
(1 *School of Life Sciences*, *Xiamen University*, Xiamen 361005, China;
2 *School of Life Sciences*, *Hunan Normal University*, Changsha 410081, China)

Abstract: Viable egg cells, synergids, central cells and zygotes of lettuce (*Lactuca sativa* L.) were isolated using enzymatic digestion and mechanical dissection. The ovaries were digested in enzymatic solution for 40－50 min, and then transported into the isolation solution without enzymes to dissect. In the dissected embryo sacs, the outline of an egg cell, two synergids and a central cell could be observed. When dissected embryo sacs were sliced from the chalazal end, four cells could be released by gently pushing its micropylar end. In optimal condition, 29 embryo sacs and 11 egg cells could be isolated from 40 ovaries during 90 min. The isolated egg cells could be collected using micromanipulator for preparation of molecular biology of egg cell of lettuce. The isolation of egg cell of lettuce will make a great chance for in vitro fertilization in a dicot plant.

Key words: Central cell; Egg cell; Isolation; Lettuce (*Lactuca sativa*); Synergid

动物和低等植物的受精过程中, 精、卵细胞融合是在脱离母体或半脱离母体的状态下进行, 进行离体实验操作比较容易, 取得的研究结果也比较深入 (陈大元, 2000)。而高等植物的雌配子体组织生长在体细胞组织的深处, 其双受精过程发生在子房内的胚珠中, 很难进行离体操作实验 (田惠桥, 2003)。这使得对高等植物受精机制的认识还很有限。将高等植物的精卵细胞分离出来, 在没有体细胞的干扰条件下诱导融合并再生植株, 可在没有其他组织影响的单细胞水平上探索受精事件的发生过程, 为研究高等植物的受精机制、探索配子识别和合子激活等问题提供有效手段 (田惠桥, 2003)。分离的卵细胞不仅可以用以开展离体受精研究, 也提供了用分子生物学方法研究被子植物卵细胞发育和合子发育机理的实验基础 (Wang 等, 2006)。自 1985 年首次从烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中分离出第一例高等植物生活卵细胞以来 (胡适宜等, 1985), 分离生活卵细

---

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30970275)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: hqtian@xmu.edu.cn
收稿日期: 2009-07-07, 2010-03-31 接受发表
作者简介: 陈琳 (1985－) 女, 硕士研究生, 主要从事植物发育生物学研究。

胞的目标就一直吸引了科学家的兴趣。Kranz 等（1991，1993）用分离的玉米（*Zea mays*）精、卵细胞体外诱导融合并在两年后成功地再生出可育植株。Dresselhaus 等（1994）用 RT-PCR 方法得到了 128 个玉米卵细胞的 cDNA 文库，与体细胞 cDNA 文库比较后利用差异筛选法首次分离出高等植物卵细胞中特异表达的基因。之后，他们又用相同的方法取 104 个离体受精 18 h 的合子构建 cDNA 文库，与卵细胞的进行对比，从中筛选出一种位于细胞内质网的储钙蛋白基因（Dresswlhaus 等，1996）。然而，被子植物卵细胞的分离操作并不容易，到目前为止，也只在 10 余种被子植物中分离出了生活卵细胞。2007 年才在水稻（*Oryza sativa*）中成功地建立了第二例高等植物的离体受精实验体系（Uchiumi 等，2007）。双子叶植物的离体受精技术至今仍是空白。

莴苣（*Lactuca sativa* L.）属菊科，是一种高度自花授粉双子叶植物，其花药在开花前就开裂，开花时柱头上已散布了花粉，这为莴苣的杂交育种带来了一定的困难。莴苣为一室子房，只有一个具薄珠心的倒生胚珠着生在顶生胎座；胚珠具一层较厚的珠被；雌配子体发育属于蓼型（邱义兰等，2006）。本文介绍了分离莴苣生活卵细胞，助细胞和中央细胞的操作技术，为建立莴苣的离体受精实验体系创造了条件，也为用分子生物学方法深入研究这几种胚囊细胞的发育调控机制打下基础。

1 材料与方法

实验材料选用莴苣大白尖叶莴笋品种（*Lactuca sativa* L. cv. Dabaijianye），由新疆种子公司生产。十月中旬左右将莴苣种子播种于厦门大学植物园，到第二年三月底开花。莴苣每个花序含有 20～22 朵小花，小花呈黄色，花冠及雄蕊呈筒状，将雌蕊包在中间。开花前的花柱位于筒状花药的下方，花柱长约 5 mm。在开花前 1 天，花药即已裂开，有花粉落在柱头上，但并不萌发。开花时，花柱迅速伸长，从筒状花药伸出，柱头上沾满花粉，花柱最长约 10 mm。由于莴苣特殊的花器官结构和开花习性，很难进行人工去雄和授粉。

莴苣的胚珠很小，且与子房内壁紧密相连，不易将其直接剥出，故采取直接酶解子房的方法。选取开花当天的小花，剥出雌蕊，切掉花柱，将子房置于酶液中，震荡酶解 30～50 min。酶液的基本成分为：1 %纤维素酶（Onozuka RS），0.8%半纤维素酶（Hemi-cellulase），0.3%～0.8%果胶酶（Pectolyse Y-23），0～1%果胶酶（Serva）和 6%～11%甘露醇（w/v）。酶解后用吸管对子房进行吸打，可除去酶解掉的部分子房组织。将子房转移至不含酶的分离液中进行解剖。分离液的基本成分：0.04%$CaCl_2$，1%牛血清蛋白（BSA），6%～11%甘露醇（w/v）。在倒置显微镜（Leica DM IRB）下用自制解剖针对子房花柱端进行纵切，位置稍偏离中间部位，便可解剖出莴苣的胚囊。再用解剖针小心地在胚囊的合点端轻轻划破一道口子，则胚囊里的卵细胞，助细胞和中央细胞即从中逸出。分离出的胚囊细胞用 0.5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 的荧光素二醋酸酯（FDA）染色处理（Chen 等，2008），测定其活性。用 Leica DC-180 显微操作仪将分离的胚囊细胞转移，收集成群体。

莴苣开花后 4 h，卵细胞已受精形成合子；花开后 9 h，合子完成第一次分裂形成二胞原胚（邱义兰等，2007）。本实验中，在开花后 6 h 的花中，分离出的细胞是合子。

2 结果

2.1 胚囊细胞的分离

莴苣的胚珠结构比较特殊，成熟胚珠中没有珠心组织，由珠被内表皮发育成的珠被绒毡层直接与胚囊接触。在开花时的成熟胚囊中反足细胞已完全退化，胚囊由 1 个卵细胞，两个助细胞和 1 个中央细胞组成。酶解的子房用解剖针纵切，即可分离出花瓶状的胚囊（图 1：1）。在解剖出的胚囊中，卵细胞，助细胞和中央细胞的轮廓清晰可见，其中，中央细胞的体积最大，约为卵细胞的两倍大。分离的胚囊常常在其珠孔端粘连一团珠被体细胞，这很可能是胚珠合点端被切破后珠被细胞外翻后造成的，也可能是珠孔结构特殊，不易分解，使珠被体细胞粘在一起。分离胚囊的珠孔端体细胞团有利于下一步胚囊细胞分离的操作，将其作为“胚囊柄”用一个解剖针按住，再用另一个解剖针将胚囊合点端切破，再轻轻挤压胚囊珠孔端，就可使胚囊中的卵细胞，助细胞和中央细胞释放出（图 1：2）。

从开花前一天的花中分离胚囊常可分离到由 3 个细胞组成的卵器（图 1：3），在相差显微镜下，卵细胞常有一个较大的液泡，而助细胞中的液泡则不明显。另外，两个助细胞的细胞核位于同一方向，表现出与卵细胞核相反的极性，可作为区分助细胞与卵细胞的标准。然而，从开花当天的花中分离胚囊时，常常只分离出一个卵细胞

和一个助细胞（图1：4），很可能是一个助细胞已退化，而释放出的是宿存助细胞。刚释放出的助细胞呈梨形，卵细胞呈圆形。卵细胞生活力比助细胞强，有时在分离后1.5 h仍具有活性荧光。而助细胞的活性荧光则仅保持约30 min。用显微操作仪可以将卵细胞和助细胞分开，达到分离生活卵细胞的目的（图1：5，6）。进一步用显微操作仪可将同一批分离的卵细胞收集成群体（图1：7，8），达到为以后开展卵细胞的分子生物学研究打下基础的目的。

在对胚囊的切割过程中，如果在胚囊的合点端用解剖针划的切口合适，不伤及中央细胞，随着挤压胚囊珠孔端，中央细胞也会从切口处逸出。在开花前一天的小花中，中央细胞易分离，因其较大的体积也易辨别。从开花时的花中也可分离出中央细胞。然而在开花后6 h的花中，就很难分离出中央细胞，推测其已经发生受精，胚乳细胞的结构和生理状态都发生了变化。刚分离出的中央细胞体积较小（图1：9），但很快吸水膨大，体积也有增加（图1：10）。而在相同溶液中，卵细胞的体积增加不明显，表明中央细胞的渗透压比卵细胞高。分离的中央细胞也表现出了较强的活性荧光（图1：11）。用显微操作仪可将同一批分离的中央细胞进行收集操作（图1：12），达到积累中央细胞的目的。

前面结果已显示：两个助细胞毗邻卵细胞，其中一个在开花时退化。助细胞在引导花粉管进入胚囊过程中起重要功能。助细胞的退化和两个助细胞之间的差异变化研究还基本上是空白。在分离卵细胞的同时，也可进行助细胞的分离和收集（图1：13），用以进行助细胞与卵细胞之间、不同时期的助细胞发育之间的分子生物学比较研究。

取开花后6 h左右的花进行分离，即可得到合子（图1：14，15）。合子的胞质较浓密，液泡不明显或已经消失。与卵细胞相比，合子的体积变小，开花时卵细胞的直径约200 μm，而开花后6 h分离的合子直径为170 μm。采用与收集卵细胞相同的方法，也可达到收集合子的目的。

2.2 分离条件的筛选

在分离胚囊细胞的实验中，对分离条件进行了筛选。在没有酶的情况下，很难从子房中剥出胚囊。加入适当的酶，经过一段时间的酶解后，剥离子房的操作较易进行。不同酶的组合和浓度对分离效率及分离出来的胚囊细胞状态有明显影响。Y-23果胶酶的酶解性能非常强，对于子房壁和胚珠体细胞的酶解有重要作用，没有Y-23果胶酶，仅用其他酶很难剥出胚囊。对0.3%～0.8%的Y-23果胶酶进行了筛选：当Y-23果胶酶浓度较低时，酶解效果不佳，不易剥掉包围胚囊的子房组织，在0.3%的Y-23果胶酶中可分离出胚囊，但没能分离出卵细胞；在0.8%的Y-23果胶酶中，虽然较容易分离出胚囊结构，但最终分离得到的卵细胞数目不多，而且卵细胞的活性受到一定影响。以0.5%的Y-23果胶酶较合适，即可分离到较多的胚囊，又可分离到较多的卵细胞。果胶酶（Serva）在酶解中也具有一定作用，最后筛选出最佳的酶浓度为0.5%。如果该酶含量过高，则分离出来的胚囊细胞又容易发生粘连，不仅是细胞间粘连紧密，而且淀粉颗粒物质也容易粘附于细胞表面。没有果胶酶（Serva），虽也可以分离出卵细胞，但效率很低。纤维素酶和半纤维素酶的作用主要是使胚囊细胞原生质体化，易于从胚囊中释放出，二者的适宜浓度分别为1%和0.8%。

另外，酶液和分离液中的渗透压也是影响胚囊细胞分离效果的一个重要因素，在6%的甘露醇溶液中，很难分离出卵细胞。在较低的渗透压中（8%甘露醇），很难分离出完整的卵器细胞，它们从胚囊出来后很快膨大，发生破裂。这些从低渗溶液中分离出的卵细胞和中央细胞在活性检测中，具有生活力的时间很短。当酶液和分离液的渗透压较高时，胚囊细胞不易逸出切破的胚囊。结合胚囊的分离效果和胚囊细胞的分离效果以及后来分离出的卵细胞的生活状态，在酶液和分离液中加入9%～10%的甘露醇较为适宜。各种酶浓度和渗透压高低对分离胚囊细胞的影响见表1。

3 讨论

高等植物卵细胞的分离是开展离体受精研究的前提，也是利用分子生物学方法研究卵细胞发育机理的实验基础（田惠桥，2003）。目前高等植物的离体受精技术只在玉米（Kranz and Lörz，1993）和水稻（Uchiumi等，2007）两种单子叶植物中获得成功，双子叶植物的离体受精实验仍需进行

探索。莴苣生殖细胞的分离操作研究还未见报道。在本实验中，我们成功地分离出莴苣卵细胞、助细胞和中央细胞，为在莴苣中开展离体受精实验克服了主要的技术障碍（精细胞的分离相

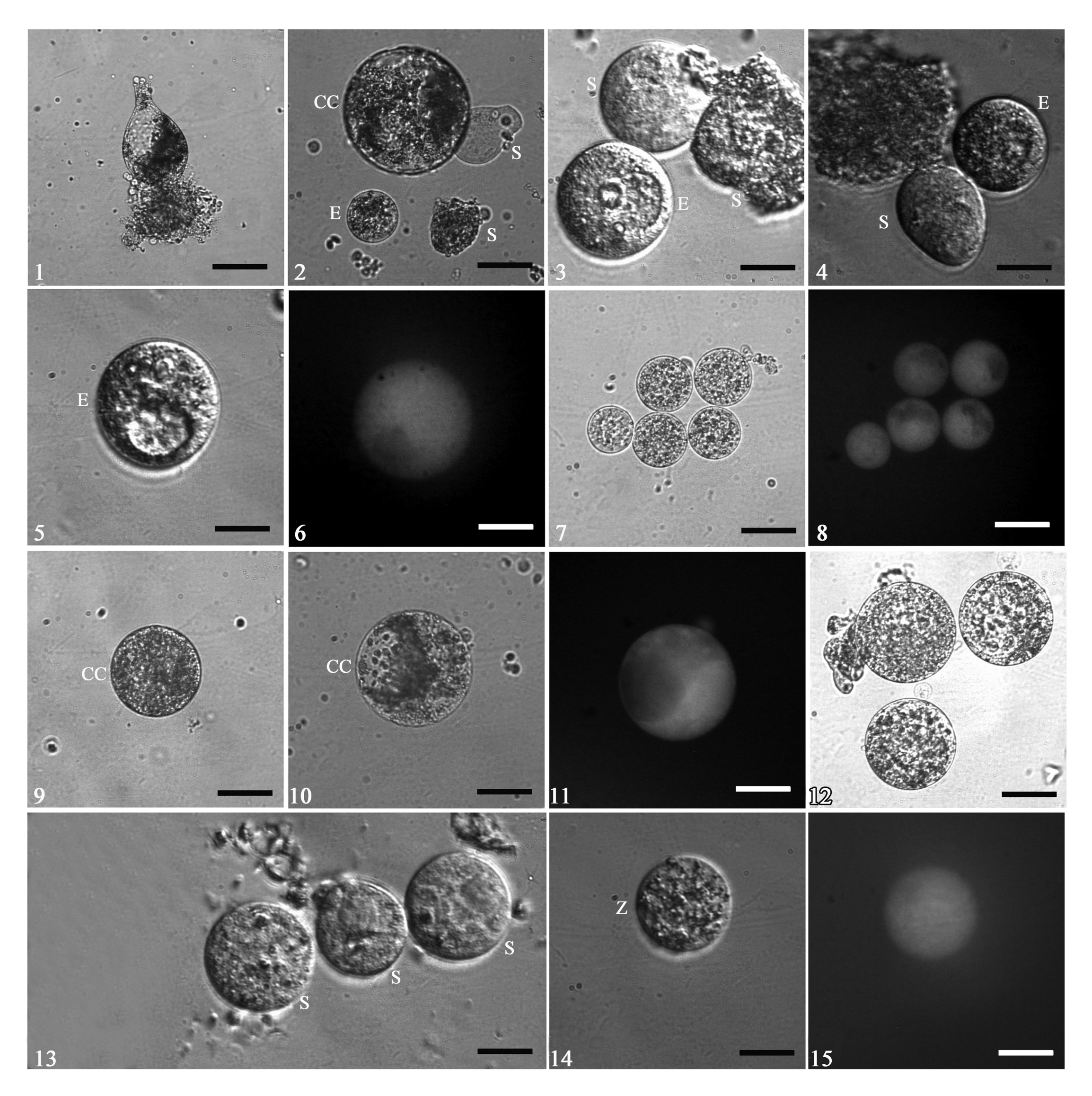


图1　1. 分离的莴苣胚囊；2. 从胚囊中逸出的4个细胞，体积最大的为中央细胞（CC）；两个助细胞（S）中的一个已具有退化状，另一个仍呈梨形；E为卵细胞；3. 开花前一天分离出的卵器三细胞；4. 开花当天分离出的一个圆形卵细胞（E）和一个梨形助细胞（S）。另一个助细胞已退化；5. 分离出的卵细胞；6. 卵细胞呈现FDA活性荧光；7. 收集的5个卵细胞；8. 收集的5个卵细胞仍呈现FDA活性荧光；9. 刚分离出的中央细胞；10. 中央细胞很容易吸水膨大；11. 分离的中央细胞呈现FDA荧光；12. 收集的3个中央细胞；13. 收集的3个助细胞；14. 分离的合子；15. 合子呈现FDA活性荧光（1，×140，bar＝70 μm；2，7～12，×350，bar＝28 μm；3～6，13～15，×700，bar＝14 μm）

Fig. 1. 1. An isolated lettuce embryo sac；2. Four cells released from an embryo sac，the biggest one is central cell (CC)，E is egg cell，between two synergids (S)，one keep pear shaped and another one has degenerated；3. Three cells of egg apparatus isolated from a flower at 1 d before anthesis；4. A round egg cell and a pear shaped synergid isolated from a flower at anthesis；5. An isolated egg cell；6. The egg cell displayed the viability by FDA reaction；7. A collecting population of five egg cells using a micromanipulator；8. The egg cells displayed the viability by FDA reaction；9. A just released central cell；10. The central cell inflated evidently11. The central cell displayed the viability by FDA reaction；12. A collecting population of three central cells using a micromanipulator；13. A collecting population of three synergid cells using a micromanipulator；14. An isolated zygote from a flower at 6 hr after anthesis；15. The isolated zygote displayed the viability by FDA reaction (1，×140，bar＝70 μm；2，7～12，×350，bar＝28 μm；3～6，13～15，×700，bar＝14 μm)

表1　酶对分离莴苣胚囊和卵细胞的影响

Table 1　Effect of enzymes on isolation of embryo sacs (ES) and egg cells

果胶酶 Pectolyse Y-23 (%)	果胶酶 Pectinase SERVA (%)	甘露醇 Mannitol (%)	分离的胚囊数 No. of ES	分离的卵细胞数 No. of egg cells
0.3	0	6	7	0
0.3	0.3	10	13	2
0.4	0.3	10	8	3
0.4	0.5	8	15	3
0.5	0	10	11	5
0.5	0.3	10	16	5
0.8	0.5	10	13	4
0.8	0.5	9	17	9
0.5	0.5	9	19	11
0.5	0.5	11	18	4
0.5	0.8	10	15	4
0.5	1	10	14	3

注：每处理用 40 个子房在 90 min 内的分离结果

Note: Each result was obtained from 40 ovaries in 90 min

对较容易些)。另外，通过筛选，在最佳条件下，90 min 内可分离出 11 个莴苣卵细胞，这样的分离数量为收集一定数量该种植物的卵细胞，用分子生物学方法研究其发育机理创造了条件。

中央细胞也是被子植物双受精的参与者，受精后形成胚乳，为胚胎的早期发育以及以后种子萌发提供了营养物质。作为双受精的产物，合子和胚乳细胞的发育命运有天壤之别，很多学者都对此表现出了极大的兴趣。然而，由于研究手段的缺乏，对此还没有明确的认识。大多数分离胚囊细胞的实验都是分离卵细胞，这固然与卵细胞的重要性有关，但也与中央细胞的分离比较困难有关。在以往的有关报道中，都是先剥出胚珠进行酶解，然后再剥出珠心，从其中间横切，切破中央细胞释放出卵细胞。例如，韭（魏冬梅等，2009）和大葱（菅明霞等，2009）的胚囊除了两层珠被组织外，还被多层珠心包裹，珠心的表皮细胞也很特殊，酶解的效果有限，只能从珠心中部、包括其中的中央细胞切破，这样就无法分离中央细胞。莴苣中央细胞的分离与其胚珠结构有很大关系，在成熟胚珠中没有珠心组织，由一层很厚的珠被包裹着胚囊。珠被的内表皮细胞形成一层特殊的珠被绒毡层细胞直接与胚囊相接触。当酶解的子房从花柱端被纵切开，珠被细胞很容易离散，珠被绒毡层也很容易和胚囊分开，使胚囊裸露，其中的中央细胞和卵器细胞都保留完好，为分离中央细胞创造了条件。一定数量的莴苣中央细胞的分离为开展中央细胞的离体受精研究提供条件，也为用分子生物学方法研究胚乳发育提供了体外实验材料，具有特殊意义。

〔参　考　文　献〕

陈大元，2000. 受精生物学. 受精机制与生殖工程［M］. 北京：科学出版社，316—378

胡适宜，李乐功，朱徵，1985. 烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离［J］. 植物学报，**27**：337—344

Chen SH，Yang YH，Liao JP *et al.*，2008. Isolation of egg cells and zygotes of *Torenia fournieri* L. and determination of their surface charge［J］. *Zygote*，**16**：179—186

Dresselhaus T，Lörz H，Kranz E，1994. Representative cDNA libraries from few plant cells［J］. *Plant Journal*，**5**：605—610

Dresselhaus T，Hagel C，Lörz H *et al.*，1996. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of *in vitro* zygotes of maize［J］. *Plant Molecular Biology*，**31**：23—31

Jian MX（菅明霞），Zhang YN（张亚楠），Wang YY（王雅英）*et al.*，2009. Isolation of egg cells from *Allium fistulosum*［J］. *Chinese Bulletin of Botany*（植物学报），**44**（3）：345—350

Kranz E，Bautor J，Lörz H，1991. *In vitro* fertilization of single，isolated gametes of maize mediated by electrofusion［J］. *Sexual Plant Reproduction*，**4**：12—16

Kranz E，Lörz H，1993. *In vitro* fertilization with isolated，single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants［J］. *Plant Cell*，**5**：739—746

Qiu YL（邱义兰），Liu YS（刘如石），Wei DM（魏冬梅）*et al.*，2007. Studies on the calcium distribution in developing synergids of lettuce（*Lactuca sativa* L.）［J］. *Journal of Molecular Cell Biology*（分子细胞生物学报），**40**（4）：253—262

Qiu YL（邱义兰），Liu YS（刘如石），Wei DM（魏冬梅）*et al.*，2006. Calcium distribution in the egg cell，zygote and proembryo of lettuce（*Lactuca sativa* L.）［J］. *Journal of Molecular Cell Biology*（分子细胞生物学报），**39**（1）：29—38

Tian HQ（田惠桥），2003. Advances in *in vitro* fertilization study of higher plants［J］. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*（植物生理与分子生物学学报），**29**（1）：3—10

Uchiumi T，Uemura I，Okamoto T，2007. Establishment of an invitro fertilization system in rice（*Oryza sativa* L.）［J］. *Planta*，**226**：581—589

Wang YY，Kuang A，Russell SD *et al.*，2006. *In vitro* fertilization as a tool for investigating sexual reproduction of angiosperms［J］. *Sexual Plant Reproduction*，**19**：103—115

Wei DM（魏冬梅），Jian MX（菅明霞），Chen L（陈琳），2009. Isolation of egg cells，zygotes and proembryos from *Allium tuberosum* Roxb［J］. *Chinese Journal of Cell Biology*（细胞生物学杂志），**31**（2）：286—290